

DOCKET NO.: 264163US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Takao FUJIMURA, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP03/08621

INTERNATIONAL FILING DATE: July 7, 2003

FOR: NOVEL METHOD OF SELECTING IMMUNOSUPPRESSANT HAVING LITTLE
THROMBOCYTOPENIC EFFECT**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

COUNTRY
Japan**APPLICATION NO**
2002-203901**DAY/MONTH/YEAR**
12 July 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP03/08621. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number
22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

Rec'd PCT/PT 07 JAN-2005

PCT/JPC3/CS031

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

07.07.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 7 月 1 2 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 2 0 3 9 0 1
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 2 0 3 9 0 1]

REC'D 22 AUG 2003

WIPO PCT

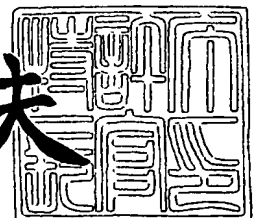
出 願 人 藤 沢 薬 品 工 業 株 式 有 限 公 司
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 8 月 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 3 - 3 0 6 3 3 3 0

【書類名】 特許願

【整理番号】 FP05202-00

【提出日】 平成14年 7月12日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪市中心区道修町 3丁目 4番 7号 藤沢薬品工業株式会社内

 【氏名】 藤村 高穂

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪市中心区道修町 3丁目 4番 7号 藤沢薬品工業株式会社内

 【氏名】 森 泰亮

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪市中心区道修町 3丁目 4番 7号 藤沢薬品工業株式会社内

 【氏名】 義澤 克彦

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪市中心区道修町 3丁目 4番 7号 藤沢薬品工業株式会社内

 【氏名】 高田 葉子

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪市中心区道修町 3丁目 4番 7号 藤沢薬品工業株式会社内

 【氏名】 荒森 一朗

【特許出願人】

 【識別番号】 000005245

 【氏名又は名称】 藤沢薬品工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100109542

【弁理士】

【氏名又は名称】 田伏 英治

【電話番号】 06-6390-1228

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 016621

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9906242

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書**【発明の名称】 血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の新規選択方法****【特許請求の範囲】**

【請求項 1】 以下の (1) から (3) からなる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

(1) IL-2 レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共存させ当該試験用細胞における IL-2 転写抑制活性を測定、

(2) GATA-1 レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共存させ、当該試験用細胞における GATA-1 転写抑制活性を測定する、

(3) (1) で求めた IL-2 転写抑制活性と (2) で求めた GATA-1 転写抑制活性を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する

【請求項 2】 請求項 1 において、IL-2 転写抑制活性として (IL-2 IC₅₀) 値を測定し、GATA-1 転写抑制活性として (GATA-1 IC₅₀) 値を測定し、両者を比較することによる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

【請求項 3】 請求項 2 に記載の方法において、(GATA-1 IC₅₀) / (IL-2 IC₅₀) 値が 5 以上の化合物を選択することによる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

【請求項 4】 IL-2 レポーター遺伝子がヒト IL-2 遺伝子の転写制御領域とレポーター遺伝子から構成され、GATA-1 レポーター遺伝子が、ヒト GATA-1 遺伝子の転写制御領域とレポーター遺伝子から構成されるものである請求項 1 から請求項 3 のいずれかの請求項に記載の方法。

【請求項 5】 IL-2 レポーター遺伝子が、ヒト IL-2 遺伝子の転写開始点近傍の -378 から +54 の領域配列を含み、GATA-1 レポーター遺伝子が、ヒト GATA-1 遺伝子の転写開始点上流の -3769 から -3133 の領域配列及び転写開始点近傍の -789 から +30 の領域配列を含むものである請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 IL-2 レポーター遺伝子を導入する試験用細胞が Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, Ionomycin 及び Anti CD28 antibody で刺激されたヒト T 細胞由来の細胞株であり、GATA-1 レポーター遺伝子を導入する試験用細胞がヒト巨核球系列の細胞株である請求項 1 から請求項 5 のいずれかの請求項に記載の方法

。【請求項 7】 請求項 6 記載のヒト T 細胞由来の細胞株が Jurkat 細胞である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 請求項 6 記載のヒト巨核球系列の細胞株が HEL 細胞である請求項 6 または請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】 レポーター遺伝子がホタルルシフェラーゼ遺伝子である請求項 1 から請求項 8 のいずれかの請求項に記載の方法。

【請求項 10】 被験物質が HDAC 阻害剤であるところの請求項 1 から請求項 9 のいずれかの請求項に記載の選択方法。

【請求項 11】 次の (1) から (3) からなる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

- (1) IL-2 蛋白の発現量を測定する、
- (2) GATA-1 蛋白の発現量を測定する、
- (3) 両者の発現量を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する

【請求項 12】 以下の (1) から (4) で構成される血小板減少作用の少ない免疫抑制剤選択の為の測定用キット。

- (1) IL-2 レポーター遺伝子を含む DNA 構築物、
- (2) GATA-1 レポーター遺伝子を含む DNA 構築物、
- (3) T 細胞系列の試験用細胞、
- (4) 巨核球細胞系列の試験用細胞

【請求項 13】 請求項 10 記載の方法により選択された血小板減少作用が少ない HDAC 阻害剤。

【請求項 14】 請求項 1-10 に記載の方法において、 $(\text{GATA-1 IC}_{50}) / (\text{IL-2 IC}_{50})$ 値が 5 以上の化合物を含む血小板減少作用の少ない免疫抑制剤。

【請求項 15】 請求項 14 に記載の方法において、 $(\text{GATA-1 IC}_{50}) / (\text{IL-2 IC}_{50})$ 値が 5 以上を示すものを選択することにより得られた化合物を有効成分として含む炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、繊維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、臓器移植片拒絶、自己免疫疾患、

癌の治療の為の請求項 14 記載の免疫抑制剤。

【請求項 16】 請求項 2 に記載の方法において、(GATA-1 IC50) / (IL-2 IC50) 値が 5 以上を示すものを選択することにより得られた化合物を有効成分として含む血小板減少作用が少ない免疫抑制剤を投与することによる炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、繊維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、臓器移植片拒絶、自己免疫疾患、癌の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

今日、臓器移植後の急性拒絶反応を抑制する為に臨床現場で広く用いられている主要な免疫抑制剤であるシクロスポリン A (Cyclosporin A, CsA) 及び タクロリムス (FK506) は、それぞれに特異的なイミュノフィリン (immunophilins: 例えば CsA の場合には cyclophilin, FK506 の場合は、FKBP12) との結合を通じて、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインホスファターゼであるカルシニューリンの活性を阻害する。その結果、NF-AT (Nuclear Factor of Activated T-cell) の脱リン酸化反応が阻害されることによって、NF-AT の核内移行が阻害され、IL-2 遺伝子の転写活性が抑制されることが知られている。このような作用メカニズムの研究から、活性化された T 細胞において IL-2 遺伝子の転写レベルでの発現が特異的に抑制されることが、臓器移植片の拒絶を抑制し、様々な自己免疫疾患等への治療効果を示す上で、極めて重要であることが明らかになっている。

ところで、ヒストンの脱アセチル化を触媒する一群のヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase, 以下 HDAC と称す) は、細胞核内で、ヒストンアセチル化酵素と競合的に働き、クロマチン構造の変換を通じて、様々な遺伝子の発現レベルを制御していることが知られている。これまでの精力的なスクリーニングから HDAC 阻害活性を示す化合物が数多く得られているが、それらの中には顕著な IL-2 の産生阻害活性を示す化合物が含まれおり (I. Takahashi et al., (1995) T

he Journal of Antibiotics 49, 453-457)、シクロスポリンやタクロリムスを補完する免疫抑制剤の候補として注目されている。実際、このようにして選択された化合物の中にはインビボ (in vivo) において優れた免疫抑制作用を示すものが見出されている。例えば、W000/08048 に開示されているように、FR225497 は、その強力な免疫抑制作用によって、臓器移植片拒絶 (organ transplant rejection)、自己免疫疾患 (autoimmune diseases) の治療剤や予防剤として優れた効果を示すことが見出されているが、それに加えて、遺伝子発現の異常によって発症すると考えられている他の数多くの疾患の治療剤や予防剤としての有用性も示唆されている。それらの疾患の中には、例えば、炎症性疾患 (inflammatory disorders)、糖尿病 (diabetes)、糖尿病性合併症 (diabetic complications)、ホモ接合型サラセミア (homozygous thalassemia)、繊維症 (fibrosis)、肝硬変 (cirrhosis)、急性前骨髄球性白血病 (acute promyelocytic leukaemia, APL)、原虫感染症 (protozoal infection)、癌 (tumor) などが含まれる。しかしながら、このような有用性にもかかわらず、これらのHDAC阻害活性を示す化合物の多くは、生体に投与した場合に、重篤な血小板減少の副作用を生じやすいという問題点があり、実際の治療薬としての利用を困難にしていた。

【0003】

免疫抑制活性を示すHDAC阻害剤の多くが血小板減少の副作用を生じやすい原因については、現在のところ、まだ十分に解明されているわけではない。しかしながら、本発明者らは、鋭意研究する中で、HDAC活性を阻害する化合物の多くがGATA-1 (GATA-1 binding protein, GF-1, NF-E1,あるいはEryf 1とも呼ばれている) 遺伝子の転写活性をも阻害していることを見出した。

【0004】

GATA-1は、造血系遺伝子の転写制御領域に特徴的に存在する(A/T)GATA(A/G)コンセンサス配列を認識するDNA結合蛋白質である。このGATAモチーフ配列は、各種グロビン遺伝子のエンハンサー領域、 β -グロビン遺伝子のローカス制御領域 (locus control regions, LCRs)、T細胞受容体 α -鎖、 δ -鎖遺伝子のエンハンサー領域などの様々な制御領域やプロモータで見出されている。また、GATA-1 mRNAは、成熟赤血球細胞・マスト細胞・巨核球などで高発現しており、多機

能性前駆細胞や若齢マウスの精巣にもわずかに発現が見られる。

【0005】

GATA-1蛋白質には、C4型Znフィンガー領域 (C4-type zinc finger) が2個所存在する。これらのうち特にN-末端側に存在するZnフィンガーは、Fog-1 (Friend of GATA-1) などの転写共役因子との相互作用を通して、赤血球や巨核球の成熟に必須の機能を担っていることが知られている。例えば、ヒトGATA-1遺伝子はX染色体上に存在しているが、X染色体に関連した遺伝性の造血不全性貧血患者や血小板減少症患者の一部には、このZnフィンガーに対応する部位にV205M変異やD218G変異が見られることが報告されている (K.E.Nichols et al., (2000) Nat. Genet. 24, 266-270; K. Freson et al., (2001) Blood 98, 85-92)。Fog-1は、それ自身9個所のZnフィンガーを有しており、おそらくこれらを介して、プロモーター領域に結合したGATA-1と他の核内因子との結合を媒介する役割を担っていると推定される。

【0006】

GATA-1遺伝子自身のプロモーターについては、これまでに、IEプロモーター及びITプロモーターの少なくとも2種類が見出されている。それに応じて、この遺伝子の第1エクソンも2種類存在する。このうち、精巣のSertoli細胞ではITプロモーターが特異的に働き、造血系細胞では、主としてIEプロモーターが働いていると言われている。しかしながら、ITプロモーターは、Primary Erythroid Cellsの分化段階にも働くと報告されており (A. M. Vannucchi et al., (1999) Journal of Cellular Physiology 180, 390-401)、上記2種類のプロモーターが生体内でどのように使い分けられているかについて、その詳細はまだ十分に解明されている訳ではない。

【0007】

造血系細胞での転写制御には、その転写開始点から上流約0.7 kbまでの範囲内に存在すると予想されるIEプロモーター配列が重要と考えられる。この領域には、GATAモチーフやCACCCモチーフに一致する配列が含まれているが、内部に存在する制御配列の詳細については、ヒト配列そのものを直接用いた解析が、あまり報告されていない為、まだ不明の部分が多い。しかし、この領域単独では微

弱な転写活性を示すのみであり、少なくとも巨核球系細胞での発現には、さらに上流約 3.8 kb から 3.5 kb 付近に存在する約 317 塩基対の HSI 領域 (DNase I 高感受性領域) が必要であると考えられている (P. Vyas et al., (1999) Development 126, 2799-2811; S. Nishimura et al., (2000) Molecular and Cellular Biology 20, 713-723)。この HSI 領域には、GATA モチーフ配列と E-box モチーフ配列が近接した GATA-E-box モチーフが存在しており、GATA-1, GATA-2 などの GATA 因子が SCL/tal-1, E2A (TCF3, transcription factor 3), LMO-2 (LIM only protein 2) や Ldb-1 (LIM domain binding factor-1) などの核内蛋白質と複合体を形成して相互作用している可能性が示唆される。HSI 領域の配列の中には、ヒトとマウスの間で、かなりよく保存された領域が存在する。

【0008】

GATA-1 遺伝子を通常の方法でノックアウトしたマウスは、1 次造血細胞の形成障害から胚発生の段階で致死的となる (Y. Fujiwara et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12355-12358)。一方、巨核球系列の GATA-1 遺伝子発現だけを選択的にノックアウトさせたマウスを作製することは可能であり、このようなマウスにおいては、血小板数が激減し、巨核球系細胞の正常な成熟も見られないことが判明している (R. A. Shivdasani et al., (1997) The EMBO Journal 16, 3965-3973)。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

これまでの研究から、GATA-1 が、赤血球系や巨核球系の細胞分化や成熟に決定的な役割を果たしていることが判明している (X. Tang et al., (2001): CMLS, Cell. Mol. Lif Sci. 58, 2008-2017)。しかしながら、巨核球系列の細胞分化や成熟には、GATA-1 以外にも他の多くの因子が関与していることが示唆されており、HDAC 阻害剤の多くで見られる血小板減少作用が GATA-1 そのものを介したものであるかどうかについては、今までのところ、まったく不明であった。本発明者等の今回の研究は、様々な HDAC 阻害剤の作用を比較検討することによって、それら薬剤の投与によって生じる血小板減少作用が、GATA-1 遺伝子の転写抑制作用によってもたらされている可能性を初めて明らかにしたものである。

【0010】

以上のように、インビトロ (in vitro) でHDAC阻害活性を示す化合物の中から、免疫抑制作用を有するものが多数得られているが、重篤な血小板減少作用を示すものが多く、臨床での応用に問題がある為、必ずしも満足できるものではなかった。従って、HDAC阻害作用を有する化合物の中から、血小板減少作用を示さない化合物をさらにスクリーニングする為の優れた方法を提供することが強く求められており、本発明はこのような課題の解決をその目的とするものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、数多くの免疫抑制作用を示すHDAC阻害剤について、ラット心移植モデルでの有効用量について鋭意研究する中で、ラット心移植モデルでの免疫抑制剤としての有効性が、IL-2遺伝子の発現抑制と深く関わっていることに思い至り、この事実を確認する為に、IL-2遺伝子の転写制御領域を用いたレポーターアッセイ系の構築を行った。このレポーター遺伝子を含むDNA構築物 (DNA construct) を、活性化したT細胞由来の細胞株に導入して、様々な被験化合物を添加した際のレポーター活性の変化を測定し比較した。この結果、ラット心移植モデルでの免疫抑制剤としての有効性が、IL-2転写抑制作用とよく相関することを見出した。

【0012】

さらに、本発明者らは、これらの数多くのHDAC阻害剤の重篤な副作用である血小板減少作用については、GATA-1遺伝子の発現抑制が深く関わっていることに思い至り、この事実を確認する為に、GATA-1遺伝子の転写制御領域を用いたレポーターアッセイ系の構築を行った。これらのレポーター遺伝子を含むDNA構築物を、巨核球系列由来の細胞株に導入し、これに様々な被験化合物を添加した際のレポーター活性の変化を測定し比較した。その結果、血小板抑制作用の強い化合物ほどGATA-1遺伝子の転写を強く抑制する傾向にあることを見出した。

【0013】

そこで、本発明者は、上記の2種類の細胞を用いたレポーターアッセイ系を併用することにより、強力なIL-2転写抑制活性を示し、なおかつGATA-1転写抑制活

性の弱い化合物を選択することにより、免疫抑制活性を示し、血小板減少作用の副作用が少ない化合物を迅速に選択する為の方法を發明した。

【0014】

本發明は、IL-2レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共存させて当該試験用細胞におけるIL-2転写抑制活性を測定し、一方、GATA-1レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共存させて当該試験用細胞におけるGATA-1転写抑制活性を測定し、両者の転写抑制活性を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する方法に関する。

さらに、本發明は、IL-2蛋白の発現量を測定し、GATA-1蛋白の発現量を測定し、両者の発現量を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する方法に関する。

【0015】

さらに、本發明は、IL-2レポーター遺伝子を含むDNA構築物、GATA-1レポーター遺伝子を含むDNA構築物、T細胞系列の試験用細胞、巨核球細胞系列の試験用細胞で構成される血小板減少作用の少ない免疫抑制剤選択の為の測定用キットに関する。

【0016】

さらに、本發明は、IL-2転写抑制活性として(IL-2 IC₅₀)値を測定し、GATA-1転写抑制活性として(GATA-1 IC₅₀)値を測定し、その両者を比較して、(GATA-1 IC₅₀) / (IL-2 IC₅₀)値が5以上を示すものを選択することにより得られた化合物を有効成分として含む炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、繊維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、臓器移植片拒絶、自己免疫疾患、癌の治療剤に関する。

【0017】

すなわち、本發明は、以下の發明に関する。

《1》以下の(1)から(3)からなる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

(1) IL-2レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共存させ当該試験用細胞におけるIL-2転写抑制活性を測定、

(2) GATA-1レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共存させ、当該試験用細胞におけるGATA-1転写抑制活性を測定する、

(3) (1)で求めたIL-2転写抑制活性と(2)で求めたGATA-1転写抑制活性を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する

《2》 《1》において、IL-2転写抑制活性として(IL-2 IC50)値を測定し、GATA-1転写抑制活性として(GATA-1 IC50)値を測定し、両者を比較することによる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

《3》 《2》に記載の方法において、(GATA-1 IC50) / (IL-2 IC50)値が5以上の化合物を選択することによる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

《4》 IL-2レポーター遺伝子がヒトIL-2遺伝子の転写制御領域とレポーター遺伝子から構成され、GATA-1レポーター遺伝子が、ヒトGATA-1遺伝子の転写制御領域とレポーター遺伝子から構成されるものである《1》から《3》のいずれかに記載の方法。

《5》 IL-2レポーター遺伝子が、ヒトIL-2遺伝子の転写開始点近傍の-378 から +54の領域配列を含み、GATA-1レポーター遺伝子が、ヒトGATA-1遺伝子の転写開始点上流の-3769 から -3133の領域配列及び転写開始点近傍の-789 から +30の領域配列を含むものである《4》に記載の方法。

《6》 IL-2レポーター遺伝子を導入する試験用細胞がPhorbol 12-Myristate 13-Acetate, Ionomycin 及びAnti CD28 antibody で刺激されたヒトT細胞由来の細胞株であり、GATA-1レポーター遺伝子を導入する試験用細胞がヒト巨核球系列の細胞株である《1》から《5》のいずれかに記載の方法。

《7》 《6》記載のヒトT細胞由来の細胞株がJurkat細胞である《6》に記載の方法。

《8》 《6》記載のヒト巨核球系列の細胞株がHEL細胞である《6》または《7》に記載の方法。

《9》 レポーター遺伝子がホタルルシフェラーゼ遺伝子である《1》から《8》のいずれかに記載の方法。

《10》 被験物質がHDAC阻害剤であるところの《1》から《9》のいずれ

かのに記載の選択方法。

《11》 次の(1)から(3)からなる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

- (1) IL-2蛋白の発現量を測定する、
- (2) GATA-1蛋白の発現量を測定する、
- (3) 両者の発現量を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する

《12》 以下の(1)から(4)で構成される血小板減少作用の少ない免疫抑制剤選択の為に測定用キット。

- (1) IL-2レポーター遺伝子を含むDNA構築物、
- (2) GATA-1レポーター遺伝子を含むDNA構築物、
- (3) T細胞系列の試験用細胞、
- (4) 巨核球細胞系列の試験用細胞

《13》 《10》記載の方法により選択された血小板減少作用が少ないHDA C阻害剤。

《14》 《1》-《10》に記載の方法において、(GATA-1 IC50) / (IL-2 IC50)値が5以上の化合物を含む血小板減少作用の少ない免疫抑制剤。

《15》 《14》に記載の方法において、(GATA-1 IC50) / (IL-2 IC50)値が5以上を示すものを選択することにより得られた化合物を有効成分として含む炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、繊維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、臓器移植片拒絶、自己免疫疾患、癌の治療のための《14》記載の免疫抑制剤。

《16》 《2》に記載の方法において、(GATA-1 IC50) / (IL-2 IC50)値が5以上を示すものを選択することにより得られた化合物を有効成分として含む血小板減少作用が少ない免疫抑制剤を投与することによる炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、繊維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、臓器移植片拒絶、自己免疫疾患、癌の治療方法。

【0018】

【発明の実施の形態】

以下に、本発明について詳細に説明する。

本発明は、IL-2レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共存させて当該試験用細胞におけるIL-2転写抑制活性を測定し、一方、GATA-1レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共存させて当該試験用細胞におけるGATA-1転写抑制活性を測定し、両者の転写抑制活性を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する方法に関する。

【0019】

上記発明の『IL-2レポーター遺伝子』とは、IL-2遺伝子の転写制御領域とレポーター遺伝子とを人工的に連結させたDNA構築物 (DNA construct) を言う。IL-2遺伝子の転写制御領域としては、例えば、ヒトIL-2遺伝子 (GenBank Accession Number: X00695, Locus code: HSIL05) の転写開始点付近とその上流領域を含む配列が用いられる。本発明の目的に必須な転写制御領域の範囲としては、単に転写活性を保持しているのみならず、活性型T細胞における天然のIL-2遺伝子の転写制御様式を実質的に反映したものであることが望ましい。実際に、ヒトIL-2遺伝子に関しては、転写開始点の上流側に位置する約275塩基対の領域が存在すれば、ヒトT-リンパ芽球由来の細胞株であるJurkat (JCRB0062, Japanese Collection of Research Bioresources) において、天然のIL-2遺伝子の転写制御様式を実質的に反映したプロモーターとして機能することが報告されている (D. B. Durand et al., (1987) J. Exp. Med. 165, 395-407)。これまでの研究から、この領域には、NF-AT, OCT-1 (Octamer-binding transcription factor-1), NF- κ B, AP-1, CD28RC (CD28 responsive element binding complex), ZEB (TCF8, NIL-2-A zinc finger protein) などの蛋白の結合部位が配置していることがわかっている。従って、そのような蛋白の結合に必須な領域を含んだものであれば、IL-2レポーター遺伝子の構築に用いる領域としては、どのような長さの配列でもかまわないが、たとえば、配列表9に記載の434塩基対の領域 (上記GenBank配列において、主要な転写開始点を+1とした場合の378 から+54に相当する領域) を用いることができる。

【0020】

ヒトに対して効果的な免疫抑制剤のスクリーニング系を構成する為には、ヒト

由来のIL-2遺伝子の転写制御領域を用いることが望ましい。また、マウスやラットなどの動物モデルで有効な化合物をスクリーニングする為には、上記ヒト配列に換えて、それぞれの動物由来のIL-2遺伝子の転写制御領域を用いれば良く、そのようなDNA構築物は、通常の実験技術を有する当業者によって、容易に構築可能である。

【0021】

また、上記発明の『GATA-1レポーター遺伝子』とは、GATA-1遺伝子の転写制御領域とレポーター遺伝子とを人工的に連結させたDNA構築物を言う。GATA-1遺伝子の転写制御領域としては、ヒトGATA-1遺伝子 (GenBank Accession Number: AF196971) のIEプロモーター領域及びその上流約3.5kb付近に離れて存在するHSI領域 (DNase I高感受性領域) の両方を含むDNA断片が用いられる。本発明の目的に必須な転写制御領域の範囲としては、単に転写活性を保持しているのみならず、巨核球系細胞における天然のGATA-1遺伝子の転写制御様式を実質的に反映したものであることが望ましい。

【0022】

先述のように、GATA-1遺伝子のプロモーターについては、IEプロモーター及びITプロモーターの少なくとも2種類が存在することが知られている。このうち、HDAC阻害剤による血小板減少作用との関連においては、巨核球系細胞における転写制御と密接に関連していることが判明しているIEプロモーターの機能が重要と推定され、今回の発明ではその制御領域を利用している。

【0023】

IEプロモーターによる転写制御には、転写開始点のすぐ上流約0.7kb内に存在する配列とさらに上流に存在するHSI領域 (DNase I高感受性領域) の両方が重要である。HSI領域の5'側には、2個のCACC siteが存在し、それから約50塩基対離れて、GATA結合部位 (GATA binding site) とE-boxモチーフが約10塩基対離れて隣り合っている。このうちのGATA結合部位を壊すような変異を導入すると、赤血球や巨核球特異的な発現が見られなくなることが知られている (P. Vyas et al., (1999) Development 126, 2799-2811)。また、このGATA-E-boxモチーフのさらに3'側には、特徴的なパリンδροーム配列であるCTGTGG

C C A C A G 配列及び、G C に富む領域が存在する。G C に富む領域の中には、転写因子の E T S の結合部位に見られる G G A A 配列が存在する。これらの配列を含む GATA-1 HSI 領域のうち、5' 側の C A C C site を欠損させても、赤血球や巨核球特異的な発現が見られるが、GATA-E-box motif まで欠損させると、発現は消失する。3' 側については、最大でも E-box の下流約 250 塩基対までを含めば、エンハンサーとして機能することが報告されている。従って、以上のような必須の配列部位をすべて含んでいるならば、実際にはどのような長さの配列でもかまわないが、たとえば、ヒト GATA-1 遺伝子の I E プロモーターによる転写開始点近傍 (789 から +30: 転写開始点を +1 とする) 819 塩基対を含む領域と転写開始点上流の HIS 領域として 637 塩基対 (3769 から -3133) を含む領域を人工的に連結させたものを用いることができる。

【0024】

GATA-E-box motif 等の必須な配列部位については、通常の組換え DNA 実験の手法により、それらの必須配列を複数個タンデムに重複させた人工的な DNA 構築物を作製することが可能である。このような人工的構築物を天然の配列と入れ換えて用いることにより、当該転写制御領域の転写誘導活性を増強させることができる場合がある。

【0025】

また、様々な HDAC 阻害剤の GATA-1 転写抑制活性とマウスやラットなどの動物モデルでの血小板減少作用との相関を確認する為には、上記ヒト配列に換えて、動物由来の GATA-1 遺伝子の転写制御領域を用いて、同様の DNA 構築物を作製すればよく、そのような DNA 構築物の作製は、通常の実験技術を有する当業者によって、容易に実施可能である。

【0026】

本発明に用いられる『レポーター遺伝子』とは、遺伝子発現の目印となる特異的蛋白質をコードする構造遺伝子領域と下流の非翻訳領域 (3'-non coding region) から構成され、構造遺伝子上流側に本来存在する転写制御領域をすべて欠失したものを言う。遺伝子発現の目印となる特異的蛋白質をコードする構造遺伝子領域については、外来遺伝子断片と人工的に連結させて細胞に導入することに

より、当該外来遺伝子断片に含まれる転写制御領域からの遺伝子発現をそのレポーター遺伝子がコードする目印となる蛋白質の機能から容易に測定可能なものであれば、どのようなものでもかまわない。より好ましくは、当該目印となる蛋白質は、通常の哺乳類細胞中で安定的に存在し、同様の活性を示す内在的な蛋白質が当該細胞中に存在しないか、仮に存在しても容易に区別して測定可能なものであることが望ましい。また、より好ましくは、当該目印となる蛋白質をコードする mRNA は、細胞内で安定的に存在するものであることが望ましい。また、当該目印となる蛋白質の基質は、活性を測定するに際して、新たに添加する必要がないものであるか、あるいは添加を必要とするも、細胞内に容易に十分量取り込まれ得るものであることが望ましい。また、これらによって構成される測定系は、広範囲の直線性と高感度性を兼ね備えたものであることが望ましい。ホタル (firefly) 由来のルシフェラーゼ遺伝子、ウミシイタケ (Renilla) 由来のルシフェラーゼ遺伝子、アルカリフォスファターゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、緑色蛍光蛋白質 (GFP, Green Fluorescent Protein) 遺伝子、増強型緑色蛍光蛋白質 (EGFP, Enhanced Green Fluorescent Protein) 遺伝子、 β -グルクロニダーゼ (β -Glucuronidase) 遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (horse radish peroxidase, HRP) 遺伝子などを用いることが可能である。より好ましくは、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子を用いればよい。ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子については、改良型のルシフェラーゼ遺伝子 (luc+) を用いることにより、測定系の検出感度を上げることができる。構造遺伝子下流の非翻訳領域については、例えば SV40 ウイルスゲノム後期遺伝子由来の配列を用いることができる。

【0027】

上述の IL-2 レポーター遺伝子及び GATA-1 レポーター遺伝子は、それぞれクローニングベクターに連結し、大腸菌を宿主として増幅させる。その際のクローニングベクターとしては、大腸菌で増幅可能な複製開始点と選択マーカーをもったものであれば、特に限定されないが、例えばアンピシリン耐性マーカーと改良型のルシフェラーゼ構造遺伝子 (luc+) をコードした pGL3-Basic (Promega Corporat

ion) などを用いれば、上述のDNA構築物を容易に作製できる。その後、増幅したベクターを動物細胞に一過的に導入して、レポーター活性を測定すればよい。

【0028】

IL-2レポーター遺伝子やGATA-1レポーター遺伝子を含む DNA構築物を動物細胞へ導入する方法としては、通常のりん酸カルシウム法・リボソーム法・リボフェクチン法や エレクトロポレーション法(electroporation法, 電気穿孔法) などのいずれかによる形質転換方法を用いればよく、特に限定されない。より好ましくは、エレクトロポレーション法を用いればよい。

【0029】

免疫抑制活性を示す化合物を選択する為の系としてIL-2レポーター遺伝子を導入する『試験用細胞』については、その宿主細胞としてJurkat細胞 (JCRB0062, Japanese Collection of Research Bioresources) を用いることができるが、T細胞由来の細胞株であれば、他の細胞株を用いることも可能である。ところで、シクロスポリンA, タクロリムス等の免疫抑制剤の作用メカニズムの研究から、活性化されたT細胞においてIL-2の発現が抑制されることが、これらの薬剤による臓器移植後の急性拒絶反応の抑制効果と強く相関することが知られている。従って、被験物質の免疫抑制作用をIL-2レポーター遺伝子を用いて評価する系を構成するに際しては、試験用細胞としては、休止時ではなく活性化時のヒトT細胞の状態を実質的に反映した細胞を用いることが必要である。T細胞では、標的細胞上のCD4/CD8と抗原ペプチドを提示したMHC複合体を認識するTCR/CD3複合体を介する第1シグナルと、標的細胞上のCD80またはCD86を認識するCD28を介する第2シグナルの2種類が知られており、T細胞が活性化されている為には、上記2種類のシグナルの両方を生じるような刺激が同時に与えられているか、あるいはそれらをバイパスする刺激が与えられている必要がある。第1シグナルによって生じる非特異的なT細胞の活性化には、一群の蛋白質のリン酸化や細胞内カルシウム濃度の上昇を伴うことが知られているが、その効果は、経験上、12-Myristate 13-Acetate などのフォルボールエステルやイオノマイシン(Ionomycin)を添加することによって代替され得る。さらにこれに加えて、上記第2シグナルへ

の刺激として、Anti CD28 antibodyが用いられうる。従って、本発明に用いられる活性化された試験用細胞は、上記の宿主細胞を、Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, Ionomycin 及びAnti CD28 antibody で同時に刺激することによって得ることができる。

【0030】

同様に、血小板減少作用の少ない化合物を選択するに際しては、GATA-1レポーター遺伝子を導入する『試験用細胞』としては、巨核球系列の細胞の状態を実質的に反映した細胞株を宿主細胞に用いる必要がある。巨核球系列の細胞株であれば、特に限定されないが、例えば、ヒト由来のHEL細胞 (JCRB0062, Japanese Collection of Research Bioresources) を用いることができる。

【0031】

上記本発明の『被験物質』とは、本発明の方法による測定系にかけられる候補物質であれば、特に限定されず、低分子有機化合物、低分子無機化合物、蛋白質や核酸を含む高分子化合物、糖類等のあらゆる化合物を含み、またそれらの混合液、天然物や合成品、動植物や菌類、藻類、微生物からの抽出液のすべてを含む。

【0032】

上記本発明の『試験用細胞を被験物質と共存』させる方法としては、エレクトロポレーション法により試験用細胞にIL2レポーター遺伝子またはGATA-1レポーター遺伝子を導入する前か後に、その培養液に被験物質を添加すれば良い。より好ましくは、IL2レポーター遺伝子またはGATA-1レポーター遺伝子を導入して約1-24時間、より好ましくは約3-12時間後に、その培養液に被験物質を添加して、さらに1-24時間、より好ましくは、8-12時間程度培養すれば良い。

【0033】

上記本発明の『IL-2転写抑制活性』は、上記のIL-2レポーター遺伝子を導入した試験用細胞において、被験物質を共存させない場合のレポーター遺伝子産物の活性を測定して基準とし、被験物質を共存させた場合のレポーター遺伝子産物の活性と比較することにより求めることができる。レポーター遺伝子産物が十分安

定な蛋白質である場合には、この遺伝子産物の活性は、IL-2遺伝子転写活性にはほぼ比例することが期待される。

【0034】

同様にして、上記本発明の『GATA-1転写抑制活性』は、上記のGATA-1レポーター遺伝子を導入した試験用細胞において、被験物質を共存させない場合のレポーター遺伝子産物の活性を測定して基準とし、被験物質を共存させた場合のレポーター遺伝子産物の活性と比較することにより求めることができる。

【0035】

以上述べた方法により、IL2レポーター遺伝子を導入した試験用細胞（例えばJ arkat細胞）とGATA-1レポーター遺伝子を導入した試験用細胞（例えばHEL細胞）のそれぞれを構築することができる。そして、これらの細胞のそれぞれを様々な被験物質と共存させ、試験用細胞におけるIL-2転写抑制活性とGATA-1転写抑制活性の強さを、それぞれのレポーター遺伝子の発現を指標として検出し測定することが可能になる。血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する為には、そのような試験用細胞系においてIL-2の発現を特異的に抑えるがGATA-1の発現を抑制しない物質を選択すればよい。

実際に臨床でより有効な化合物をスクリーニングする為には、それぞれの被検物質の血小板減少作用を、該被検物質の免疫抑制作用の強さとの兼ね合いで評価することが望ましく、すなわち、該被検物質を生体に投与した際にある一定の免疫抑制作用を示す有効用量において、どの程度の血小板減少作用を生じるかが評価の基準となる。これは、より具体的には、以下のように計算される。すなわち、上述の2組のレポーター遺伝子発現系を用いて、それぞれのルシフェラーゼ発現量を定量する。その際、本発明の『IL-2 IC50値』は、被検物質を全く添加していない場合のIL-2レポーター遺伝子の発現量を100%とし、当該IL-2レポーター遺伝子の発現量を50%抑制する被検物質の添加濃度を示しており、薬物用量作用曲線から容易に算出される。この値は、生体において、ある一定の免疫抑制作用を示す有効用量、すなわち例えば免疫抑制作用を示す最小有効用量に相関すると予想される。同様にして、本発明の『GATA-1 IC50値』は、被検物質を全く添加していない場合のGATA-1レポーター遺伝子の発現量を100%とし、当該

GATA-1レポーター遺伝子の発現量を50%抑制する被検物質の添加濃度を示しており、薬物用量作用曲線から容易に算出される。このようにして算出されたGATA-1 IC50値をIL-2 IC50値で除した値（ $(\text{GATA-1 IC50}) / (\text{IL-2 IC50})$ 値）を求めると、この $(\text{GATA-1 IC50}) / (\text{IL-2 IC50})$ 値は、それぞれの被検物質を、ある一定の強さの免疫抑制作用を示す用量だけ生体に投与した際に、該用量の該被検物質が示す血小板減少作用の程度に相関すると予想される。すなわち、この $(\text{GATA-1 IC50}) / (\text{IL-2 IC50})$ 値は、例えば、それぞれの被検物質を生体に投与した際に免疫抑制作用が見られる最小有効用量における血小板減少作用の強度に相関すると予想される。実際に、レポーターアッセイのデータを基にして、上述のようにして求めた各被検物質の $(\text{GATA-1 IC50}) / (\text{IL-2 IC50})$ 値は、それぞれの被検物質をラット心移植モデルに投与した際に免疫抑制活性が見られる最小有効用量での血小板減少率と良く相関することが確かめられている。そして、 $(\text{GATA-1 IC50}) / (\text{IL-2 IC50})$ 値が、例えば5以上の化合物では、当該ラット心移植モデルにおいて免疫抑制効果を示す最小有効用量を投与した場合の血小板減少率が30%以下に抑えられることが判明している。

【0036】

また、本発明は、IL-2蛋白の発現量を測定し、GATA-1蛋白の発現量を測定し、両者の発現量を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する方法に関する。

【0037】

上記発明の『IL-2蛋白の発現量』は、IL-2レポーター遺伝子を導入しない前記試験用細胞の抽出液を被検物質で処理し、IL-2蛋白の発現量を、抗IL-2抗体及び、標識化された2次抗体を用いて測定することができる。その手法としては、放射性同位元素免疫測定法（RIA法）、ELISA法（E. Engvall et al., (1980): Methods in Enzymol., 70, 419-439）、蛍光抗体法、プラーク法、スポット法、凝集法、オクタロニー（Ouchterlony）等の、一般の免疫化学的測定法において使用されている種々の方法（「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dプランニング発行、第30頁—第53頁、昭和57年3月5日）を利用することができ、当業者であれば、容易に実施可能である。

上記手法は種々の観点から適宜選択することができるが、感度、簡便性等の点からはELISA法が好ましい。

【0038】

上記2次抗体を標識するにあたり使用される標識物質としては、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素、フルオレセインイソシアネート、ローダミン等の蛍光物質、 ^{32}P 、 ^{125}I 等の放射性物質、化学発光物質などが挙げられる。

【0039】

同様の手法により、上記発明の『GATA-1蛋白の発現量』は、抗GATA-1抗体及び、標識化された2次抗体を用いて測定することができる。

【0040】

また、本発明は、IL-2レポーター遺伝子を含むDNA構築物、GATA-1レポーター遺伝子を含むDNA構築物、T細胞系列の試験用細胞、巨核球細胞系列の試験用細胞で構成される血小板減少作用の少ない免疫抑制剤選択の為の測定用キットに関する。

【0041】

上記発明の『血小板減少作用の少ない免疫抑制剤選択の為の測定用キット』は、IL-2レポーター遺伝子とGATA-1レポーター遺伝子のそれぞれを導入した試験用細胞を被験物質と共存させ、試験用細胞におけるIL-2転写抑制活性とGATA-1転写抑制活性の強さを、IL-2レポーター遺伝子とGATA-1レポーター遺伝子の発現を指標として検出し、測定することができればよい。具体的には、以下の(1)から(4)によって構成することができる。

- (1) IL-2レポーター遺伝子を含むDNA構築物、
- (2) GATA-1レポーター遺伝子を含むDNA構築物、
- (3) T細胞系列の試験用細胞、より好ましくは、Jurkat細胞
- (4) 巨核球細胞系列の試験用細胞、より好ましくは、HEL細胞

【0042】

上記発明の『DNA構築物』とは、上述のIL-2レポーター遺伝子またはGATA-1レポーター遺伝子を含むDNAで、クローニングベクターに組込まれたものでも

、組込まれないものでもよく、また環状でも線状でもかまわない。

【0043】

また、本発明は、IL-2転写抑制活性として(IL-2 IC50)値を測定し、GATA-1転写抑制活性として(GATA-1 IC50) 値を測定し、その両者を比較して、(GATA-1 IC50) / (IL-2 IC50)値が5以上を示すものを選択することにより得られた化合物を有効成分として含む炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、繊維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、臓器移植片拒絶、自己免疫疾患、癌の治療方法及び治療剤に関する。

【0044】

前述の評価方法に基づいて、IL-2転写抑制活性として(IL-2 IC50)値を測定し、GATA-1転写抑制活性として(GATA-1 IC50) 値を測定し、その両者を比較して、(GATA-1 IC50) / (IL-2 IC50)値が5以上を示すものを選択することにより得られた化合物は、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤として臓器移植片拒絶、自己免疫疾患の治療や予防に有用である。そして、遺伝子発現の異常によって発症すると思われる以下のような疾患の治療や予防に有用である。

炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、繊維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、癌

本発明においてこれらを医薬品として用いる場合には、それ自体として医薬品として用いることも可能であるが、公知の製剤学的方法により製剤化して用いることも可能である。例えば、薬理学上許容される担体若しくは媒体、具体的には滅菌水、生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤等、製剤に用いられる公知のものと適宜組み合わせた医薬製剤の形態、例えば固体、半固体または液体（例えば錠剤、丸剤、トローチ剤、カプセル剤、坐薬、クリーム剤、軟膏剤、エアロゾル剤、散剤、液剤、乳剤、懸濁剤など）で用いることができる。

【0045】

患者への投与は、鼻、眼、外部（局所）、直腸、肺（鼻または口内注入）、経口または非経口（皮下、静脈および筋肉内を含む）投与または吸入に適している。注射剤の投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等の公知の方法により行なうことができる。投与量は、患者の体重、年齢及び病状、並びに、用

いる投与方法等により変わるものであるが、当業者であれば、適切な投与量を適宜選択することが可能である。

【0046】

【実施例】

次に実施例および参考例を挙げ、本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例等に何ら制約されるものではない。

【0047】

実施例 1

HDAC阻害薬投与による血小板減少作用の確認

8週齢の雄性LewisラットにHDAC阻害薬化合物Bを7日間経口投与した。群構成は投与量0, 3.2 mg/kg, および10mg/kgの3群とし、1群5例のラットを供した。最終投与の3時間後に採血して、血小板数を測定した。

図1に、このようにして測定された各群の血小板数を示す。化合物Bの投与量に依存して血小板数の減少が認められることが示された。

次に、採血後のラットから脾臓をサンプリングし、その下縁部の一部を巨核球数のカウント用に4%PFAにて固定し、パラフィン切片を常法により作製し、HE染色を施した。各個体について1切片上の巨核球数を、対物10倍のレンズを用いて明視野下にてカウントし、その数を切片の面積で除算したものを脾臓内の巨核球数とした。

図2に、このようにしてカウントされた巨核球数の群平均を示す。化合物Bの投与量依存的に脾臓内の巨核球数が増加することが示された。

【0048】

実施例 2

HDAC阻害薬を投与したラット脾臓におけるGATA-1 mRNAの定量

実施例1でサンプリングした脾臓の残りをすべて凍結後、RNeasy (RNA抽出キット) をもちいてTotal RNAを抽出し、これを鋳型として、Random Primer法にてcDNAを合成した。続いてこのcDNAを鋳型としてABI Prism7700を用いてReal-time PCR (SYBR法) によりGATA-1のcDNAを増幅させ、その増殖曲線によりGATA-1のmRNA量を定量した。

巨核球1個あたりのGATA-1の転写量を正確に定量する為に、巨核球で特異的に発現し、HDAC阻害薬の投与によっても、巨核球1個あたりでの発現量にあまり変動をきたさない遺伝子をmRNA定量の内部標準として用いる必要がある。そこで、巨核球系の培養細胞であるHEL細胞におけるHDAC阻害薬による遺伝子発現の変動をGene Chip (Affymetrix) を用いて解析し、Glycoprotein IIb (GPIIb) を内部標準として選択した。

図3にそのGPIIbを内部標準として測定したGATA-1の発現量を示した。HDAC阻害薬化合物Bの投与量に依存してGATA-1の転写抑制が認められた。

以上の実験結果から、HDAC阻害薬投与によって血小板減少が認められたラットにおいて、巨核球でのGATA-1の転写抑制が見られることが判明した。

【0049】

実施例 3

IL-2 Reporter Gene Assay用のReporter Gene Plasmidの構築

ヒトIL-2遺伝子転写開始点近傍の-674 ~ +54の領域（IL-2遺伝子の主要な転写開始点を+1とする）をカバーするDNA断片を、ヒトT細胞由来のJurkat細胞より単離したGenomic DNAをTemplateにして、PCR法により取得した。PCRに用いたプライマーの配列を、配列表の配列番号1及び2に示す。これらプライマーは遺伝子データベースGenBankに記載されたヒトIL-2遺伝子配列（Locus code: HSIL05, Accession Number: X00695）に基づいて設計され、その末端には、Reporter Gene Assay用ベクターに挿入するための制限酵素認識部位が付加された。すなわち、増幅DNA断片のPromoter上流側にはNhe I認識部位、Promoter下流側にHind III認識部位が形成されるように設計された。PCRにより増幅したDNA断片をクローニングベクターpCR4（Invitogen社製）に挿入し、得られたPlasmidから挿入領域の塩基配列を確認した。その結果、上記のGenBankに記載されたIL-2遺伝子のPromoter配列と比較して、3ヶ所の塩基置換、1ヶ所の2塩基挿入及び1ヶ所の1塩基挿入部位を除いて、一致することが確認された。その731塩基対からなる全塩基配列を、配列番号8に示す。このようにして得られたPlasmidをNhe I認識部位及びHind III認識部位で切断して、さらに得られた断片を、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むReporter Gene Assay用ベクターpGL3 basic（Promega社製）のNh

e I - Hind III部位に挿入した。これにより、ヒトIL-2遺伝子の転写開始点近傍の-674 ~ +54の領域728塩基対に相当する731塩基対のDNA配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に有するプラスミドpGL3 IL2 Proを得た。

次に、pGL3 IL2 ProをTemplateにして、ヒトIL-2遺伝子の転写開始点近傍の-378 ~ +54の領域をカバーするDNA断片を、PCR法により取得した。PCRに用いたプライマーの配列を、配列表の配列番号3及び2に示す。配列番号3のプライマーは前述のpGL3 IL2 Proに挿入されているDNA配列を元に設計された。プライマーの末端には、Reporter Gene Assay用ベクターに挿入するための、制限酵素認識部位が付加されており、増幅DNA断片においてPromoter上流側にNhe I認識部位、Promoter下流側にHind III認識部位を有するように設計されている。PCRにより増幅したDNA断片をクローニングベクターpCR4に挿入し、得られたPlasmidを用いて、その挿入領域の塩基配列を確認した。この挿入領域は、GenBankのLocus code: HSIL05に記載されたIL-2のPromoter配列の-378 ~ +54の領域と比較すると、2ヶ所の塩基置換部位と1ヶ所の2塩基挿入部位を除いて、他は一致した。434塩基対からなるその全塩基配列を配列番号9に示す。このようにして得られたPlasmidをNhe I認識部位及びHind III認識部位で切断し、得られた断片を、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むReporter Gene Assay用ベクターpGL3 basicのNhe I - Hind III部位に挿入した。これにより、ヒトIL-2遺伝子転写開始点近傍-378 ~ +54の432塩基対に相当する434塩基対のPromoter配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に有するプラスミドpGL3 IL2 Pro43を得た（図4）。

【0050】

実施例 4

GATA-1 Reporter Gene Assay用のReporter Gene Plasmidの構築

ヒトGATA-1遺伝子転写開始点近傍の-789 ~ +30の領域、819塩基対断片を、ヒトGenomic DNAをTemplateにして、PCR法により取得した。PCRには、配列表の配列番号4及び5に示したプライマーを用いた。これらプライマーは遺伝子データベースGenBankのAccession番号AF196971に記載されたヒトGATA-1遺伝子配列を元に設計し、プライマーの末端には、Reporter Gene Assay用ベクターに挿入するための制限酵素認識部位を付加して、増幅DNA断片のPromoter上流側にBgl II認識

部位、Promoter下流側にHind III認識部位が形成されるようにした。PCRにより増幅したDNA断片をクローニングベクターpCR4に挿入した。得られたPlasmidを用いて、挿入領域の塩基配列を確認したところ、GenBankのAccession番号AF196971に記載されたGATA-1のPromoter配列と完全に一致していた。その全塩基配列を配列番号10に示す。さらに、得られたPlasmidをNhe I認識部位及びHind III認識部位で切断した。得られた断片を、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むReporter Gene Assay用ベクターpGL3 basicのNhe I - Hind III部位に挿入した。これにより、GATA-1遺伝子のPromoter領域-789 ~ +30の819塩基対の配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に有するプラスミドpGL3-IE Promoterを得た(図5)。

【0051】

次に、ヒトGATA-1遺伝子転写開始点上流-3769 ~ -3133の領域、637塩基対断片を、ヒトGenomic DNAをTemplateにして、PCR法により取得した。PCRには、配列表の配列番号6及び7に示したプライマーを用いた。これらプライマーは遺伝子データベースGenBankのAccession番号AF196971に記載されたヒトGATA-1遺伝子配列に従って設計され、プライマー末端には、Reporter Gene Assay用ベクターに挿入するための制限酵素認識部位が付加されて、増幅DNA断片のPromoter上流側にKpn I認識部位、Promoter下流側にNhe I認識部位が形成されるようにした。PCRにより増幅したDNA断片をクローニングベクターpCR4に挿入し、得られたPlasmidを用いて、挿入領域の塩基配列を確認したところ、GenBankのAccession番号AF196971に記載されたGATA-1遺伝子の転写開始点上流配列と完全に一致していた。637塩基対からなるその全塩基配列を配列番号11に示す。このようにして得られたPlasmidをKpn I認識部位及びNhe I認識部位で切断し、得られたDNA断片を、pGL3-IE PromoterのKpn I Nhe I部位に挿入した。これにより、GATA-1遺伝子の転写開始点上流-3769 ~ -3133の領域の637塩基対、及び-789 ~ +30の819塩基対の配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に有するプラスミドpGL3-HSI-IE Promoterを得た(図6)。

【0052】

実施例 5

IL-2転写抑制作用を有するHDAC阻害剤のスクリーニング系の構築

実施例3で得られた $1\text{ }\mu\text{g}$ の pGL3 IL2 Pro43 と $6\text{ }\mu\text{g}$ の任意のキャリアーPlasmid を混和し、エレクトロポレーション法（電圧300V、電荷975 μF 、400 μL ）により、 1×10^7 cells の Jurkat 細胞を形質転換した。形質転換後、2.5 mL の 10 % FBS を含む RPMI 1640（10 % FBS RPMI 1640）を加え、50 μL /well の割合で、96-well white plate に分注した。37 °C、5 % CO₂、飽和湿度条件下で12時間培養後、終濃度の4倍濃度の化合物D（HDAC阻害剤）を含む10 % FBS RPMI 1640培地を25 μL /well ずつ加え、更にPhorbol 12-Myristate 13-Acetate（PMA, SIGMA）、Ionomycin（SIGMA）、Anti CD28 antibody（Pharmingen）を10 % FBS RPMI 1640で混合した液25 μL /well ずつ加え（終濃度それぞれ50 ng/mL、1 μg /mL、75 ng/mL）、Jurkat 細胞を刺激した。37 °C、5 % CO₂、飽和湿度条件下で12時間培養後、Bright-Glo™ Luciferase Assay System（Promega Corporation）のマニュアルに従い、細胞内のルシフェラーゼ活性を、マルチラベルカウンター（1420 MULTILABEL COUNTER ARVO SX, WALLAC）により測定した。その結果、PMA、Ionomycin、Anti CD28 antibody による Jurkat 細胞への刺激に応答して、pGL3 IL2 Pro43 からルシフェラーゼが誘導されることがわかった（図7）。更に、誘導されるルシフェラーゼの発現量は、化合物Dにより用量依存的に抑制されることがわかった（図7）。また、化合物Dによるルシフェラーゼの発現量の抑制が、化合物Dによって細胞が何らかの障害を受けた結果ではないことは、Cell Counting Kit-8（同仁化学研究所）を用いて確認した（図8）。以上の結果から、本アッセイ系が、IL-2転写抑制作用を有するHDAC阻害剤のスクリーニングに使用可能なことがわかった。

【0053】

実施例 6

GATA-1転写抑制作用を有するHDAC阻害剤化合物Dのスクリーニング系の構築

実施例2で得られた15 μg の pGL3-HSI-IE Promoter を用いて、エレクトロポレーション法（電圧1750V、電荷10 μF 、365 μL ）により、 8.75×10^6 cells の HEL 細胞（JCRB0062、Japanese Collection of Research Bioresources）を形質転換した。形質転換後、2 mL の 10 % FBS RPMI 1640 を加え、50 μL /well の割合で、96

-well white plateに分注した。37℃、5% CO₂、飽和湿度条件下で3時間培養後、終濃度の2倍濃度のHDAC阻害剤化合物Dを含む10% FBS RPMI 1640培地を50 µL/wellずつ加えた。37℃、5% CO₂、飽和湿度条件下で8時間培養後、Bright-GloTM Luciferase Assay System (Promega Corporation) のマニュアルに従い、細胞内のルシフェラーゼ活性を、マルチラベルカウンターにより測定した。その結果、pGL3-HSI-IE PromoterからGATA-1のPromoterに依存したルシフェラーゼが誘導され、更に、誘導されるルシフェラーゼの発現量は、化合物Dにより用量依存的に抑制されることがわかった(図9)。また、化合物Dによるルシフェラーゼの発現量の抑制が、化合物Dによって細胞が何らかの障害を受けた結果ではないことは、Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いて確認した(図10)。以上の結果から、本アッセイ系が、GATA-1転写抑制作用を有するHDAC阻害剤のスクリーニングに使用可能なことがわかった。

【0054】

実施例 7

免疫抑制作用を有するHDAC阻害剤のラット心移植の最小有効用量における血小板減少率の確認

被験物質としてランダムに選んだHDAC阻害剤9化合物(表1及び表2に示す)について、ACIラットをDonor、LewisラットをRecipientとした頸部への異所性心移植(Cuff法)モデルにおいて評価した。各化合物は10% HCO-60 (Polyoxyl 60 Hydrogenated Castor Oil) /Waterを溶媒として経口にて、或いは10% HCO-60/salineを溶媒として皮下にて、移植当日から1日1回・14日間連日投与した。心拍動の停止を拒絶と判断し、その前日までを生着日数とした。尚、対照群(溶媒投与群)の生着日数の中央値が5日であることから、8日以上中央値をもって有効と判断し、それぞれの最小有効用量を求めた。

【0055】

次に、それぞれ求めた最小有効用量の薬剤量を、正常Lewisラットに薬効試験と同一の投与経路にて1日1回計7回投与した。最終投与日翌日に採血し、各個体の血小板数を測定し、各群(n=4)の平均値から対照群(control)に対する減少率(%)を求めた。

表1及び表2に、このようにして求めた各種HDAC阻害剤のラット心移植モデルにおける最小有効用量と血小板減少率を示す。最小有効用量と判断される用量を下線太字で示した。

【0056】

【表1】

化合物	投与 経路	Dose (mg/kg)	ラット心移植における効果		血小板減少 率 (%)
			生存日数(日)	中央値(日)	
Control (溶媒)	p. o.		5, 5, 5, 5, 5, 5, 6, 6	5	0
化合物A	s. c.	10	5, 5, 5, 5, 6, 6, 10	5	
		<u>32</u>	17, 17, 18, 19, 19, 21	18.5	75
化合物B	p. o.	1	5, 5, 5, 6, 6, 6, 9	6	
		<u>3.2</u>	7, 7, 11, 11, 11, 11, 27	11	37
化合物C	p. o.	3.2	4, 4, 4, 5, 5, 5, 5, 5, 6	5	
			5, 5, 5, 5, 12, 15, 17, 2		
		<u>10</u>	0	8.5	44
化合物D	p. o.	3.2	5, 5, 6, 6, 6, 6, 6	6	
		<u>10</u>	18, 19, 19, 19, 20, 21, 24	19	40

【0057】

【表 2】

化合物	投与 経路	Dose (mg/kg)	ラット心移植における効果		血小板減少 率 (%)
			生存日数(日)	中央値(日)	
化合物E	p. o.	0.32	5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 9	5	
		<u>1</u>	5, 6, 7, 11, 17, 18, 20	11	34
化合物G	s. c.	0.56	5, 5, 6, 9	5.5	
		<u>1.8</u>	5, 9, 9, 9	9	23
化合物F	s. c.	0.32	4, 5, 10, 10	7.5	
		<u>1</u>	21, 21, 23, 23	22	27
化合物H	s. c.	0.32	5, 6, 6, 6	6	
		<u>1</u>	12, 15, 16, 17, 20, 21, 22	17	8.5
化合物I	s. c.	0.56	N. T.		
		<u>1.8</u>	18, 18, 19, 19	18.5	17

【0058】

実施例 8

免疫作用を有しかつ血小板減少作用の少ないHDAC阻害剤を選択する方法

被験物質として表3に示す化合物を使用し、実施例3に示したIL-2転写抑制作用を有するHDAC阻害剤のスクリーニング方法を用いてアッセイを行い、被験物質を添加していない場合のルシフェラーゼの発現量を100%とした場合の薬物用量作用曲線から、ルシフェラーゼの発現量を50%抑制する薬物濃度を、薬物によるIL-2の転写抑制に対するIC50値 (IL-2 IC50) として算出した (表3)。次に、被験物質として表1に示す化合物を使用し、実施例4に示したGATA-1転写抑制作用を有するHDAC阻害剤のスクリーニング方法を用いてアッセイを行い、被験物質を添加していない場合のルシフェラーゼの発現量を100%とした場合の薬物用量

作用曲線から、ルシフェラーゼの発現量を50%抑制する薬物濃度を、薬物によるGATA-1の転写抑制に対するIC50値 (GATA-1 IC50) として算出した (表3)。更に、GATA-1 IC50をIL-2 IC50で除した値を、G/I比として求めた (表3)。実施例5で得られた被験物質のラット心移植の最小有効用量での血小板減少率と、本実施例で得られたG/I比をプロットしたところ (図11)、良好な相関が得られた。そして、G/I比が、5以上の化合物では、ラット心移植モデルにおいて免疫抑制効果を示す最小有効用量で、血小板減少率が30%以下に抑えられていることがわかった。以上の結果から、本アッセイ系が、免疫作用を有しかつ血小板減少作用を起こしにくいHDAC阻害剤をスクリーニングするのに適した方法であることが確認された。

【0059】

【表3】

HDAC阻害剤	Reporter Gene Assay IC50		Ratio
	(nM)		
	IL-2	GATA-1	GATA-1/IL-2
化合物A	342.9	475.7	1.39
化合物B	32.3	117.3	3.63
化合物C	8.7	32.6	3.73
化合物D	27.5	117.3	4.27
化合物E	30.7	150.5	4.90
化合物F	23.1	128.0	5.53
化合物G	14.8	91.0	6.16
化合物H	6.1	37.8	6.20
化合物I	19.6	148.6	7.58

【0060】

【発明の効果】

本発明の方法によれば、2種類の細胞を用いたレポーターアッセイ系を併用することにより、強力なIL-2転写抑制活性を示し、同時にGATA-1転写抑制活性の弱

い化合物を迅速にスクリーニングすることが可能である。このような方法で選択された免疫抑制剤は、従来より高い確率で血小板減少の副作用を示さない安全性の高い創薬キャンディデイトとなることが期待されるので、本発明の方法は、新薬創出の為の研究に極めて有用である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、血中の血小板数 (n=5) が、HDAC阻害薬化合物Bの投与量に依存して減少することを示した図面である。

【図 2】 図 2 は、脾臓内の巨核球数 (n=5) が、HDAC阻害薬化合物Bの投与量に依存して増加することを示した図面である。

【図 3】 図 3 は、GPIIbを内部標準として測定した脾臓内の単位巨核球あたりのGATA-1の発現量 (n=5) が、HDAC阻害薬化合物Bの投与量に依存して抑制されることを示した図面である。

【図 4】 図 4 は、プラスミッドpGL3 IL2 Pro43のマップを示す。

【図 5】 図 5 は、プラスミッドpGL3-IE Promoterのマップを示す。

【図 6】 図 6 は、プラスミッドpGL3-HSI-IE Promoterのマップを示す。

【図 7】 図 7 は、IL-2 レポーター遺伝子におけるルシフェラーゼ活性が、化合物D濃度依存的に阻害されることを示した図面である。

【図 8】 図 8 は、IL-2 レポーター遺伝子アッセイ系における細胞増殖が、化合物D濃度非依存的であることを示した図面である。

【図 9】 図 9 は、GATA-1 レポーター遺伝子におけるルシフェラーゼ活性が、化合物D濃度依存的に阻害されることを示した図面である。

【図 10】 図 10 は、GATA-1 レポーター遺伝子アッセイ系における細胞増殖が、化合物D濃度非依存的であることを示した図面である。

【図 11】 図 11 は、HDAC阻害剤によるラットでの免疫抑制作用及び血小板減少作用と細胞レベルでのIL-2及びGATA-1転写抑制作用に対する相関を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> New methods for selecting an immunosuppressive agent
having the reduced risk for causing thrombocytopenia as
its side effect

<130> FP05202-00

<140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer-1

<400> 1

tcgctagcct gagtatttaa caatcgacc ct

32

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer- 2

<400> 2

cgaagcttgt ggcaggagtt gaggttactg

30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer-3

<400> 3

cgctagctgc tcttgtccac cacaatatgc

30

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer-4

<400> 4

atagatctat ccctggtcc cacctcag

28

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer-5

<400> 5

ataagctttg gtggttgagg agggttcg

28

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer-6

<400> 6

atggtaccac cccagaagat gccaggag

28

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer- 7

<400> 7

atgctagcgc cctctgagcc tcagtttc

28

<210> 8

<211> 731

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(731)

<223> Human interleukin-2 (IL-2) gene 5'-flanking
region

<220>

<221> TATA_signal

<222> (652)..(657)

<220>

<221> misc_feature

<222> (676)

<223> The putative transcription initiation site of the
IL-2 gene promoter

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(731)

<223> Corresponding to the sequence (689-1416) in the
GenBank database (Acession: X00695), except for
several variations.

<220>

<221> variation

<222> (38)

<223> 1 bp insertion

<220>

<221> variation

<222> (196)

<223> T to A exchange

<220>

<221> variation

<222> (346)

<223> T to G exchange

<220>

<221> variation

<222> (577)

<223> T to A exchange

<220>

<221> variation

<222> (688)..(689)

<223> 2 bp insertion (CT)

<400> 8

```
ctgagtattt aacaatcgca ccctttaaaa aatgtacaat agacattaag agacttaaac 60
agatatataa tcattttaaa ttaaaatagc gttaaacagt acctcaagct caataagcat 120
ttaagtatt ctaatcttag tatttctcta gctgacatgt aagaagcaat ctatcttatt 180
gtatgcaatt agctcattgt gtggataaaa aggtaaaacc attctgaaac aggaaaccaa 240
tacacttcct gttaaatcaa caaatctaaa catttattct tttcatctgt ttactcttgc 300
tcttgccac cacaatatgc tattcacatg ttcagtgtag ttttaggaca aagaaaattt 360
tctgagttac ttttgtatcc ccaccccctt aaagaaagga ggaaaaactg tttcatacag 420
aaggcgtaa ttgcatgaat tagagctatc acctaatgtt gggctaattgt aacaaagagg 480
gatttcacct acatccattc agtcagtcct tgggggttta aagaaattcc aaagagtcac 540
cagaagagga aaaatgaagg taatgttttt tcagacaggt aaagtctttg aaaatatgtg 600
taatatgtaa aacattttga ccccccata atatttttcc agaattaaca gtataaattg 660
catctcttgt tcaagagttc cctatcactc tctttaatca ctactcacag taacctcaac 720
tcctgccaca a 731
```

<210> 9

<211> 434

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(434)

<223> Human interleukin-2 (IL-2) gene 5'-flanking
region

<220>

<221> TATA_signal

<222> (355)..(360)

<220>

<221> misc_feature

<222> (379)

<223> The putative transcription initiation site of the
IL-2 gene promoter

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(434)

<223> Corresponding to the sequence (+985 to +1416) in
the GenBank database (Acession: X00695), except
for several variations.

<220>

<221> variation

<222> (49)

<223> T to G exchange

<220>

<221> variation

<222> (280)

<223> T to A exchange

<220>

<221> variation

<222> (391)..(392)

<223> 2 bp insertion (CT)

<400> 9

```
tgctcttgtc caccacaata tgctattcac atgttcagt tagtttagg acaaagaaaa 60
ttttctgagt tacttttgta tccccacccc cttaaagaaa ggaggaaaaa ctgtttcata 120
cagaaggcgt taattgcatg aattagagct atcacctaag tgtgggctaa tgtaacaaag 180
agggatttca cctacatcca ttcagtcagt ctttgggggt ttaaagaaat tccaaagagt 240
catcagaaga ggaaaaatga aggtaatgtt ttttcagaca ggtaaagtct ttgaaaatat 300
gtgtaatatg taaaacattt tgacaccccc ataatatatt tccagaatta acagtataaa 360
ttgcatctct tgttcaagag ttccctatca ctctctttaa tcactactca cagtaacctc 420
aactcctgcc acaa 434
```

<210> 10

<211> 819

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(819)

<223> Human GATA- 1 gene promoter region

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(819)

<223> Corresponding to the sequence (5342-6160) reported
by K. Blechschmidt et al. / GenBank (Accession:
AF196971)

<220>

<221> misc_feature

<222> (790)

<223> The putative transcription initiation site of the
GATA-1 gene IE promoter

<400> 10

```
atccctggct cccacctcag tttcccgct ccaaggcagc atggcgggca agaagttgag 60
gccactgtcc ctgggtgttc ctacccccac accctcacc caagacagcc tggttactgcg 120
gcgccaacag ccacggctgc ctacatctga taagacttat ctgctgcccc agggcaggcc 180
ggagctggcg taagccccag tggggcgcta agtgagtgtg cccctgcctc ccgccagcac 240
tggcctggcc tgcaggctta gcctgggtca tcaaggtatc ccacaggctc tagttcaa 300
ccagcagaac ctctctgagc ctactcttc tcacctgcaa aatgggtaca gccacatccc 360
ttctctccct gcagccagga agacgcacat acacaggagt ctagcccaca ccggccccgc 420
acaaattaag ggctttactc tctgaaaagc ccagtgaagt catgaaacca tatctgctat 480
tttcatttat cttggtttca gcctattttg cttgtctgga cactacagtc cacgggagcc 540
taggtcgagc gaggtccaag aatccccagg gtgggcaggg aggggtggaag agggcctcca 600
gtgccaaga ggtgccccac aagcatggga cccgcccct cccctggact gccccacca 660
ctggggcacc agccactccc tggggaggag ggaggaggga gaaggaggag agggaggagg 720
ggaggaaggg agcctcaaag gccaaaggcca gccaggacac cccctgggat cacactgagc 780
ttgccacatc cccaaggcgg ccgaaccctc cgcaaccac 819
```

<210> 11

<211> 637

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(637)

<223> Human GATA- 1 gene enhancer region

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(637)

<223> Corresponding to the sequence (2362-2998)
reported by K. Blechschmidt et al. / GenBank
(Accession: AF196971)

<400> 11

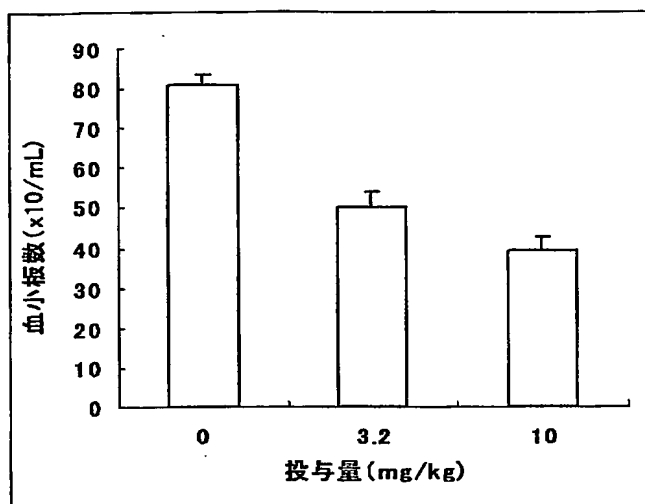
acccagaag atgccaggag ggagtgagcc agtcaggga ggcttccgag aagagaggac 60
attgaagaag agtctcaaac ttaggcctga cggagaagac gcgcggccag gacacccac 120
ccccgccctc gtctcccca aagcctgac tggccccact gattccctta tctgccact 180
cccagctgcc tccttgctgg ctgaactgtc gccgcagact tctgagcctg cgccccctcc 240
acggggatgg gggagggaat ggggtgaggc ctggcctcac agcctcgggg tttccagctc 300
ttgctggagg cagggtcttg gggcgcccta ctctcaccc ttggcttctc ttcctgagcg 360
ctctgtgctc tccagaaatg aagaaatggg gtgagtccag cggccaaacc cttgtcttag 420
ctcttagaca tgcctcgagc ctgccattcc ctgtgaggac agatttcct atgttgcgac 480
cgctgcttct aataataata atgatgatga taattcccat ttacagagca caccatttat 540

ggtgtgccag caggccctgt gctgagtggg tcctaccac gtggggggct aggactttac 600
ccgttttcca gatgaagaaa ctgaggctca gagggcg 637

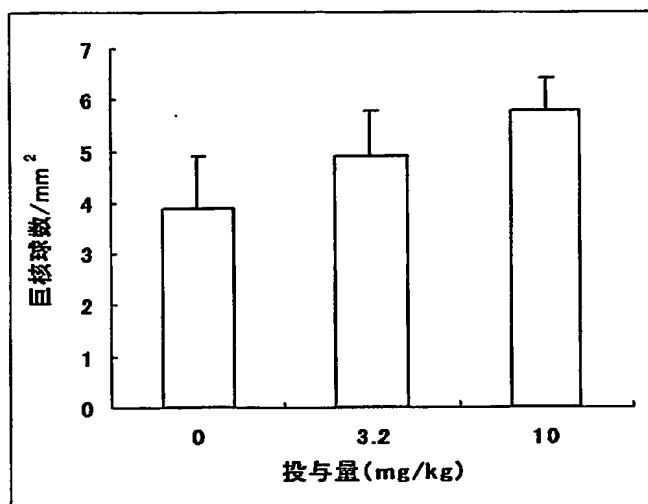
【書類名】

図面

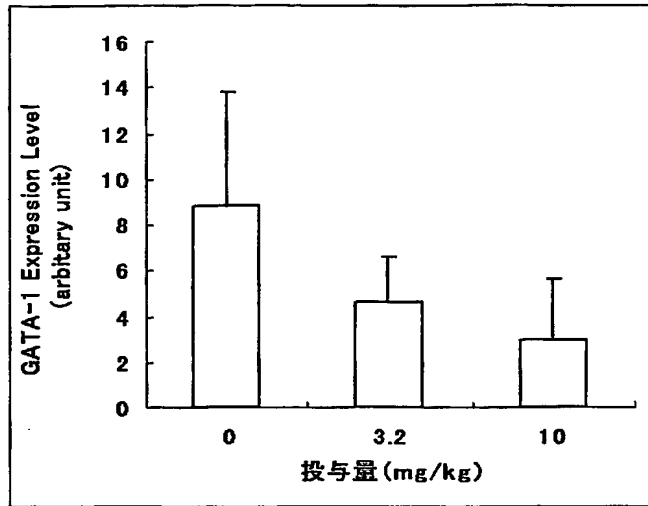
【図 1】



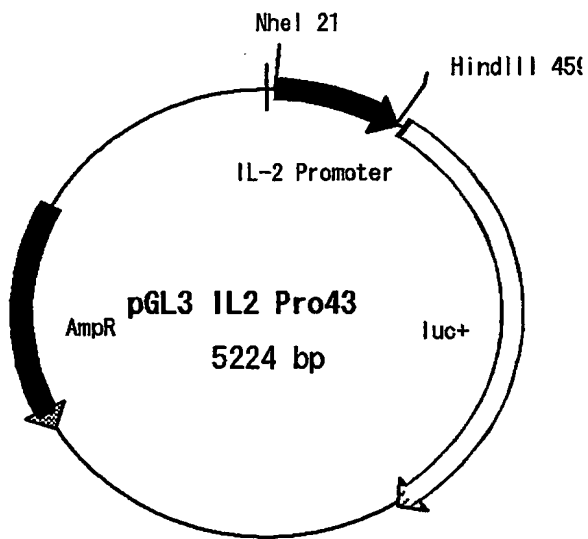
【図 2】



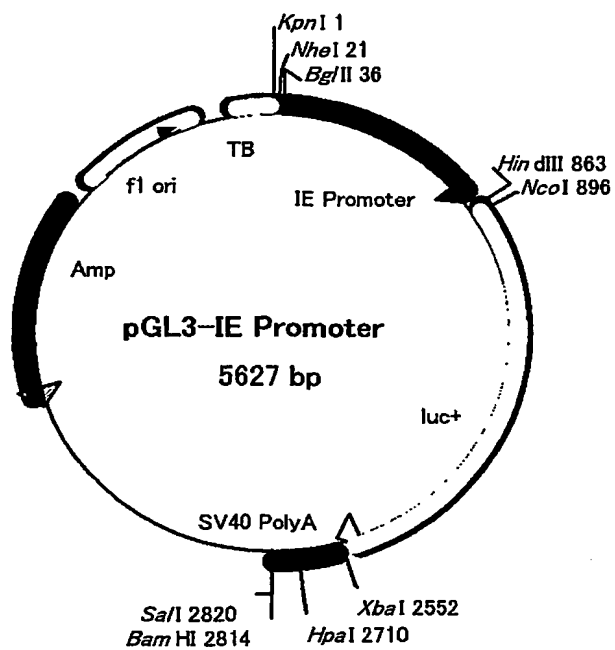
【図 3】



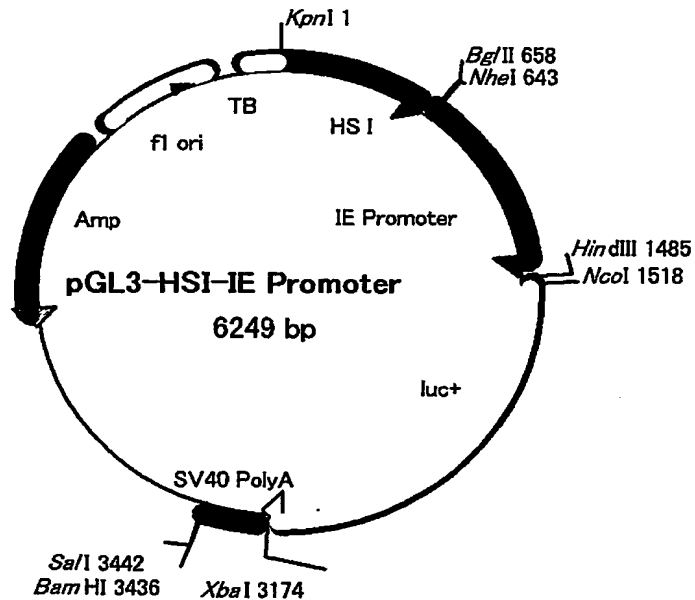
【図 4】



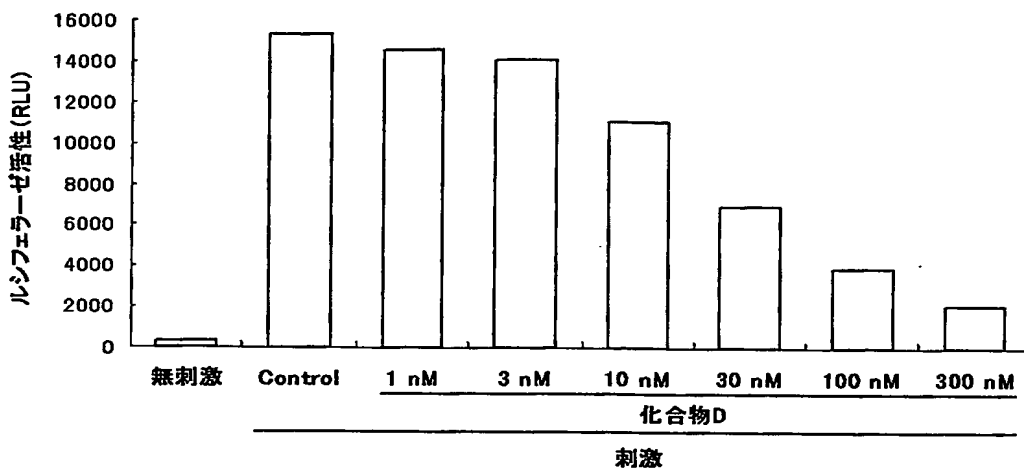
【図 5】



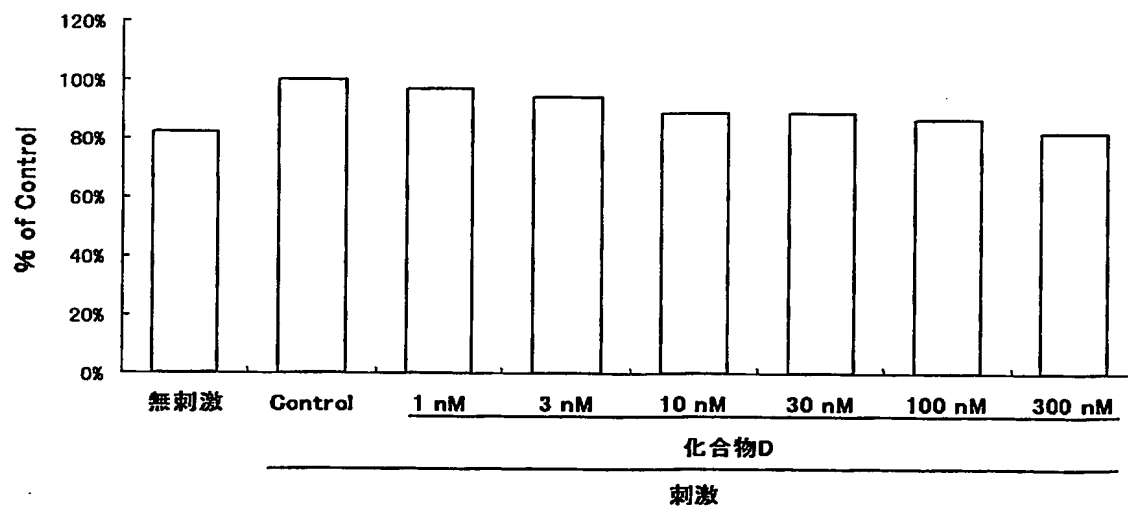
【図 6】



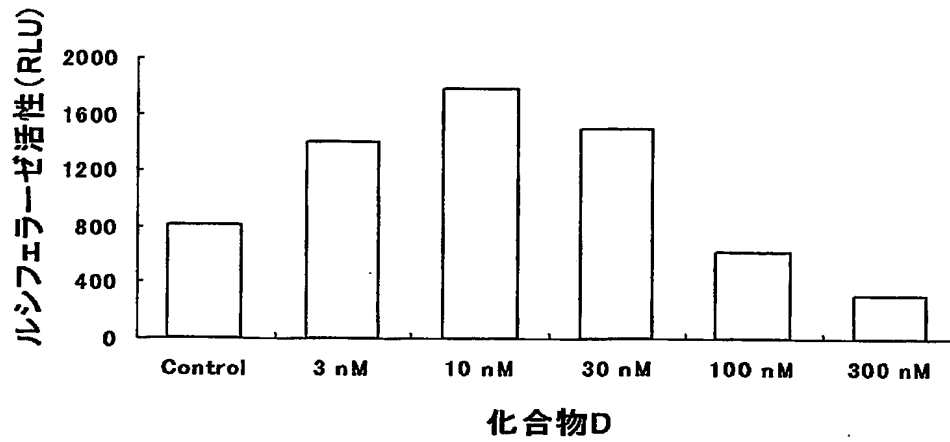
【図 7】



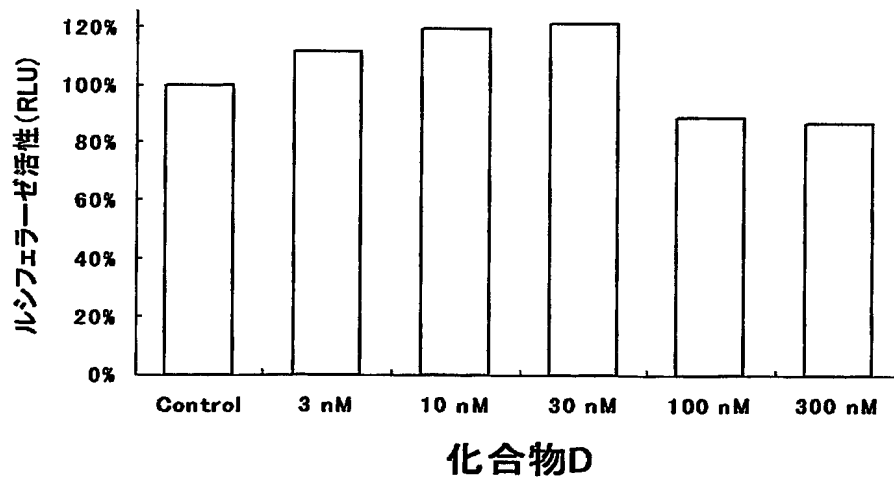
【図 8】



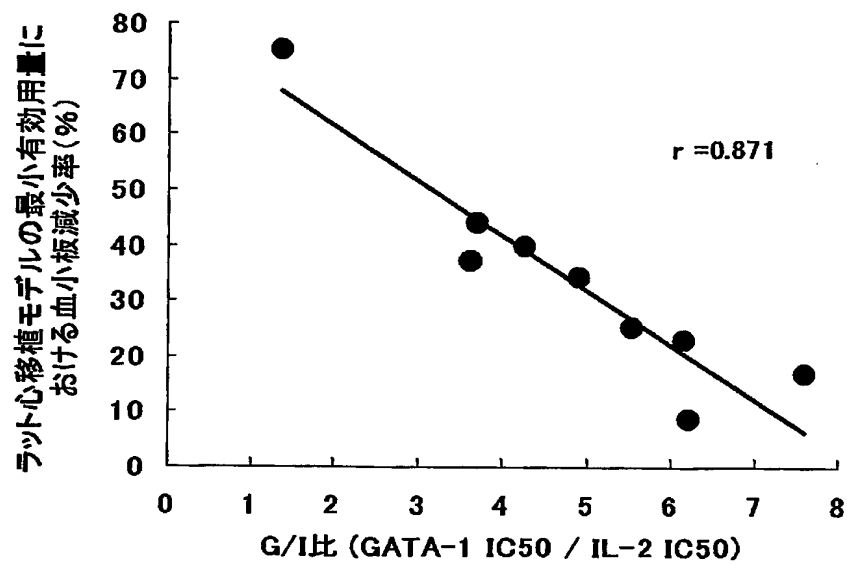
【図 9】



【図 10】



【図11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の新規選択方法を提供する。

【解決手段】 I L - 2 レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共存させて当該試験用細胞における I L - 2 転写抑制活性を測定し、一方、G A T A - 1 レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共存させて当該試験用細胞における G A T A - 1 転写抑制活性を測定し、両者の転写抑制活性を比較することにより、強い免疫抑制活性を示しながら、血小板減少の副作用が少ない化合物を簡便に選択する方法が提供された。

【選択図】 なし

特願 2002-203901

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[000005245]

1. 変更年月日

1990年 8月17日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号

氏 名

藤沢薬品工業株式会社